

АНАЛИЗ ВОССТАНАВЛИВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ШТАММОВ РОДА *SHEWANELLA*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ПРИРОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ, НА ПРИМЕРЕ БИОСИНТЕЗА НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

© 2024 г. Т. А. Воейкова^{1,*}, О. А. Журавлева¹, Т. Л. Бабич², С. Н. Малахов¹, Т. Д. Пацаев¹,
А. Л. Васильев¹, Е. И. Кожухова³, П. А. Жданов³, А. Ю. Власова^{1,4},
А. И. Килочек^{1,5}, В. Г. Дебабов¹

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, ККНБИКСПТ, Москва, Россия

²Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ биотехнологии РАН, Москва, Россия

³Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, ККХИ, Москва, Россия

⁴МИРЭА – РТУ, ИТХТ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁵Московский политехнический университет, Москва, Россия

*E-mail: voeikova.tatyana@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.12.2023 г.

После доработки 01.12.2023 г.

Принята к публикации 05.12.2023 г.

Впервые проведен сравнительный анализ восьми штаммов рода *Shewanella*, выделенных из различных природных источников, по уровню восстанавливающей активности ионов Ag^+ до серебросодержащих наночастиц (NPs). Получены характеристики биогенных NPs в отношении формы, размера, параметров кристаллической решетки, гидродинамического диаметра, ζ -потенциала, оптических характеристик с использованием методов просвечивающей растровой электронной микроскопии, динамического рассеяния света, спектрофотометрии, атомно-эмиссионной спектроскопии и оценки биоцидной активности в отношении различных видов микроорганизмов, включая исследуемые штаммы рода *Shewanella*. Установлено, что форма NPs близка к сферической, размеры варьируют от 2 до 30 нм, образцы представляют собой полидисперсные коллоидные системы. Анализ кристаллических решеток NPs подтверждает присутствие NPsAg , а также NPsAg_2O_2 и NPsAg_3O_4 в некоторых образцах. Получены результаты атомно-эмиссионной спектроскопии по количественному анализу содержания Ag в образцах наноматериала, на основании которого выявлены штаммы с высокой способностью к образованию Ag -содержащего наноматериала. Установлена высокая чувствительность Грам(+) бактерий к NPsAg . Продемонстрирован различный уровень устойчивости восьми штаммов рода *Shewanella* к действию биогенных NPsAg . Результаты свидетельствуют о метаболическом разнообразии штаммов рода *Shewanella*, выделенных из различных природных источников. Анализ штаммов рода *Shewanella* по уровню восстановительной активности актуален для разработки эффективной технологии “зеленого” синтеза биогенных NPs.

DOI: 10.56304/S1992722323601179

ВВЕДЕНИЕ

Наночастицы (NPs) металлов широко применяются в различных отраслях науки и техники, в сельском хозяйстве, медицине. Физико-химические методы получения наноматериала часто требуют технологически сложного оборудования, энергозатратны, приводят к образованию токсичных отходов. Поэтому существует потребность в разработке экономически эффективных и экологически безопасных способов синтеза NPs. Метод “зеленого” синтеза NPs с использованием биологических субстанций, в частности микроорганизмов, является перспективным, технологически простым и малозатратным способом по-

лучения биосовместимых, стабильных биогенных NPs различного химического состава [1, 2]. При микробном синтезе NPs восстановителями ионов металлов и стабилизаторами наноматериала являются ферменты, белки, полисахариды, аминокислоты и другие биомолекулы, синтезируемые клетками в процессе культивирования. Биогенные NPs характеризуются различной формой, размерами, физико-химическими свойствами и составом поверхностного слоя биомолекул [3, 4]. Для биосинтеза NPs проводится поиск микроорганизмов, способных к эффективному восстановлению ионов металлов и образованию стабильного наноматериала. Грамотрицательные бактерии, представители рода *Shewanella* семей-

ства *Shewanellaceae*, проявляют значительный потенциал в производстве биогенных NPs. Род *Shewanella* насчитывает более 50 видов, из которых около 20 видов обладают способностью восстанавливать ионы металлов за счет универсальных механизмов дыхания [5]. С помощью микроорганизмов рода *Shewanella* были синтезированы NPs тяжелых и переменного валентных металлов, таких как Ag, As, Au, Cr, Mn, Pb, Se, Te, Tc, Zn, U, а также сульфиды и оксиды металлов [6, 7]. Бактерии рода *Shewanella* широко распространены в почве, пресной и морской воде, гидротермальных источниках, подземных водах, являясь участниками окислительно-восстановительных процессов, а также биоремедиации загрязненной почвы и водоносных горизонтов за счет своей способности к восстановлению нитратов и ионов металлов до наночастиц с нулевой валентностью [8].

Модельным организмом для изучения внеклеточного транспорта электронов и восстановления ионов металлов является штамм *S. oneidensis* MR-1, способный к окислению различных органических субстратов – доноров электронов – с восстановлением широкого круга терминальных акцепторов, как растворимых, так и нерастворимых. Восстановлению этих акцепторов электронов способствует сложная многокомпонентная система транспорта электронов, в составе которой мультигемовые цитохромы *c*-типа располагаются на внутренней стороне цитоплазматической мембраны, в периплазме и внешней мембране, образуя единый ансамбль [9]. В энергетический обмен клетки также вовлечены флавины – секретируемые бактериями медиаторы переноса электронов [10] – и нанопровода, в состав которых входит белок пилин [11].

Несмотря на тесное эволюционное родство видов рода *Shewanella*, штаммы, выделенные из разных местообитаний, имеют большие генетические различия и вариации механизмов восстановления металлов [12–14]. Сравнительный пангеномный анализ 24 штаммов рода *Shewanella* продемонстрировал обширную изменчивость генома, около 14% которого составляли постоянно встречающиеся гены, тогда как 86% было переменным с высоким уровнем приобретения и потери генов в ходе эволюции. Показано, что у штаммов *Shewanella* варьирует количество генов, связанных с восстановлением металлов, их распределение по штаммам, в ряде случаев присутствуют уникальные гены, что связано, по-видимому, с различными способами адаптации к условиям окружающей среды и отражает функциональное и метаболическое разнообразие представителей этого рода [15].

В этой связи интересно было оценить реальные способности различных штаммов рода *Shewanella* к восстановлению ионов металлов, опре-

делить количественные параметры процесса биосинтеза наноматериала с последующим анализом характеристик NPs. В настоящей работе описаны результаты сравнительного анализа восьми штаммов рода *Shewanella*, выделенных из различных природных источников, по способности к восстановлению ионов Ag⁺ и формированию биогенных серебросодержащих NPs. Были исследованы штаммы, принадлежащие видам: *S. oneidensis* MR-1 (1 штамм), *S. putrificiens* (5 штаммов), *S. xiamenensis* (2 штамма). Для биогенных NPs определены форма, размер, параметры кристаллической решетки, величины гидродинамического диаметра, ζ -потенциала, оптические характеристики и антимикробная активность в отношении различных видов микроорганизмов, включая исследуемые штаммы рода *Shewanella*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы рода Shewanella. Штамм *S. oneidensis* MR-1 (B-9861) получен из БРЦ ВКПМ НИЦ “Курчатовский институт”. Штаммы видов *S. putrificiens* (A-4-3, 28 Вуг, 34 Вуг, 44 Вуг, M1) и *S. xiamenensis* J1-6-2-2, *S. xiamenensis* DCB2-1 (B-3220) получены из коллекции лаборатории нефтяной микробиологии ФИЦ биотехнологии РАН. Источниками выделения штаммов в различные годы являлись буровой раствор, используемый при бурении скважин в газоносные горизонты (Волгоградская обл., РФ), и подземные воды, отобранные из наблюдательных скважин в Томской и Челябинской областях (РФ) и из нефтяного месторождения в КНР. Тест-культуры для определения антимикробной активности NPs – *Bacillus licheniformis* (B-10956), *Streptococcus salivarius* (B-5994), *S. oneidensis* MR-1, *Escherichia coli* K-12 (B-3345) получены из БРЦ ВКПМ НИЦ “Курчатовский институт”.

Бактериальный синтез NPs Ag проводили с использованием штаммов рода *Shewanella*, которые предварительно культивировали на агаризованной среде Luria-Bertani (LBA) следующего состава (г/л дистиллированной воды): триптон – 10, дрожжевой экстракт – 5, NaCl – 5, агар – 17, pH 7, при 28–30°C в течение 48 ч. Для получения наноматериала штаммы выращивали в колбах объемом 750 мл, содержащих 100 мл среды LB, из состава которой был исключен компонент NaCl, на круговой качалке (28–30°C, 220 об./мин, 22–24 ч). Пробы культуральной жидкости (КЖ) для определения оптической плотности (ОП) бактериальных суспензий отбирали из колб на 22 ч культивирования штаммов. Определение оптической плотности КЖ проводили с использованием фотокориметра КФК-3КМ (Юнико-Сис, Россия) при длине волны 600 нм (ОП₆₀₀). Далее в колбы с КЖ бактерий вносили водный раствор соли AgNO₃ до конечной концентрации 2 мМ и культивиро-

вали в тех же условиях. Процесс восстановления ионов Ag^+ и образование NPsAg сопровождались изменением цвета КЖ от светло-желтого до темно-коричневого. Визуально фиксировали степень потемнения реакционной смеси (РС) в первые 10 мин. По истечении 24 ч повторно фиксировали изменение окраски РС в колбах. Выделение, очистку и концентрирование NPsAg проводили по методике [16]. Из 100 мл РС каждого штамма получали по 3 мл концентрированных водных образцов NPsAg , которые помещали в эпепендорфы и хранили при 4°C. Для определения ОП образцов NPs при длине волны 400 нм (ОП_{400}) исходные водные суспензии разводили дистиллированной водой в 10 раз.

Характеристики биогенных NPs

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ). Форму и размер NPs определяли с использованием растрового электронного микроскопа (РЭМ) Versa 3D DualBeam (ThermoFisher Scientific, США). Образцы водных суспензий Ag -содержащих NPs наносили на специальные медные сетки со сплошным слоем углерода, которые затем помещали в камеру РЭМ. Изображения были получены с помощью просвечивающей растровой электронной микроскопии (ПРЭМ) с использованием детектора STEM II в режиме светлого поля при высоком вакууме при ускоряющем напряжении 30 кВ и токе 70 пА. Диаметр биогенных NPs оценивали с использованием программного обеспечения Fiji [17], измеряя наименьший линейный размер 100 NPs на ПРЭМ-изображениях. Гистограммы распределения по размерам NPs были построены в OriginPro 2021 с применением программного пакета статистического анализа. Межплоскостные расстояния (МПП) в кристаллах NPs исследовали методами ПЭМ, включающей в себя просвечивающую электронную микроскопию высокого разрешения, и просвечивающей растровой электронной микроскопии на просвечивающем/растровом электронном микроскопе (П/РЭМ) Osiris (ThermoFisher Scientific, США) при ускоряющем напряжении 200 кВ. Прибор оборудован высокоугловым кольцевым темнопольным детектором (Fischione, США). Обработку изображений выполняли с помощью программного обеспечения Digital Micrograph (Gatan, США) и TIA (Thermo Fisher Scientific, США).

Метод динамического рассеяния света (ДРС). Гидродинамический диаметр (ГД) и электрокинетический потенциал (ζ -потенциал) NPs определяли при помощи анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания), оснащенного гелий-неоновым лазером с длиной волны 632.8 нм и углом рассеяния 173°. Для измерения ζ -потенциала методом электрофоретическо-

го рассеяния света применяли поликарбонатную U-образную капиллярную кювету DTS1070 с длиной оптического пути 10 мм. Перед началом измерения раствор термостатировали при 25°C.

Регистрацию УФ-видимых спектров поглощения биогенных NPs проводили на двухлучевом сканирующем спектрофотометре Specord 250 PLUS (Analytik Jena AG, Германия) и спектрофотометре Varian Cary 100, оснащенный термостатической ячейкой Пельтье при 25°C. Все спектры регистрировали в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 10 мм в диапазоне длин волн 190–1100 нм. Спектры флуоресценции образцов NPs регистрировали посредством спектрофлуориметра “Флюорат-02-Панорама” (Люмэкс, Россия) со значениями длин волн возбуждения ($\lambda_{\text{в}}$) 275, 390 и 415 нм. Перед регистрацией спектров флуоресценции определяли области длин волн спектров поглощения образцов, которые затем использовали в качестве $\lambda_{\text{в}}$.

Определение элементного содержания серебра в образцах NPs проводили методом атомно-эмиссионной спектроскопии (АЭС) с использованием атомно-эмиссионного спектрометра с индуктивно-связанной плазмой iCAP-6300 Duo (Thermo Scientific, США). В качестве пробоподготовки из водных суспензий отбирали навески по 0.5 г каждого образца NPs , предварительно растворяли в 2.5 мл концентрированной азотной кислоты и доводили раствор до 50 мл дистиллированной водой. Измерение содержания серебра проводили с помощью многоэлементного градуировочного стандарта по ГОСТ 55845-2013.

Оценка уровня биоцидной активности NPs. Ингибирующее действие NPs на рост тест-культур Грам(+) и Грам(–) бактерий оценивали методом диффузии NPs в агаризованную среду. Состав сред соответствовал потребностям штамма и содержал 0.8% агара для бактерий. Тест-культуры бактерий предварительно выращивали в чашках Петри. Затем клетки бактерий переносили микробиологической петлей в 1 мл стерильной воды (титр клеток $\sim 1 \times 10^9$ кл/мл), суспендировали и вносили в 40 мл охлажденной до 30°C питательной среды, перемешивали и разливали в чашки Петри диаметром 90 мм. После охлаждения среды в толще агара металлическим пробойником делали лунки диаметром 8 мм. Для определения чувствительности бактериальных штаммов к NPs в каждую лунку вносили по 50 мкл водной суспензии NPs . В качестве контроля в лунки вносили стерильную воду в том же объеме. Далее чашки инкубировали при оптимальной температуре роста микроорганизмов в течение времени, необходимого для развития тест-культуры. Эксперимент проводили трижды, воздействие биогенных NPs на тест-культуры оценивали по величине диаметра зоны ингибирования (в мм). Расчет аб-

Таблица 1. Параметры процесса биосинтеза NPsAg с использованием штаммов рода *Shewanella* и средний диаметр наночастиц

Образец	Штамм, номер	ОП ₆₀₀ КЖ	ОП ₄₀₀ суспензий NPsAg, разведенных в 10 раз	Количество Ag в исходных образцах NPs, мг/г	Содержание Ag в NPs, %	Средний диаметр NPs, нм
1	<i>S. putrefaciens</i> A-4-3	0.556	0.101	0.20	27	17.0
2	<i>S. putrefaciens</i> 28 Byr	0.549	0.635	0.81	110	14.8
3	<i>S. putrefaciens</i> 34 Byr	0.487	0.703	0.89	120	9.7
4	<i>S. putrefaciens</i> 44 Byr	0.495	1.102	1.24	168	8.9
5	<i>S. putrefaciens</i> M1	0.420	0.366	0.52	73	6.1
6	<i>S. xiamenensis</i> J1-6-2-2	0.481	0.247	0.33	45	6.9
7	<i>S. xiamenensis</i> DCB 2-1	0.471	0.278	0.39	53	5.1
8	<i>S. oneidensis</i> MR-1	0.615	0.352	0.74	100	11.4

солютной единицы измерения (АЕ) зоны ингибирования тест-культуры проводили по уравнению: $AE = Y^2/X^2$, где Y – радиус зоны ингибирования вокруг каждой лунки, X – радиус лунки, 4 мм [18]. Данную методику также использовали для оценки действия образцов NPs 1–8 на восемь исследуемых штаммов рода *Shewanella*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ штаммов по уровню восстанавливающей активности ионов серебра. Предварительное выращивание штаммов на среде LBA продемонстрировало практически одинаковый интенсивный рост культур с образованием типичных колоний. Результаты культивирования штаммов в жидкой среде LB, которые оценивали по значению ОП₆₀₀ КЖ на 22-м часе роста бактерий, показали близкие значения этого параметра (~0.500), что свидетельствует о сходной интенсивности роста большинства штаммов (табл. 1). Наибольшее значение ОП₆₀₀ 0.615 продемонстрировал штамм *S. oneidensis* MR-1. Известно, что уровень восстанавливающей активности штамма зависит от ряда показателей, таких как фаза роста культуры, количество клеток, состав и pH среды, температура, продолжительность инкубации с солями металлов. В [19] было показано, что ранняя стационарная фаза роста клеток *S. oneidensis* MR-1, соответствующая 22–24 ч культивирования в среде LB по предложенной методике, является оптимальной для эффективного восстановления ионов металлов, при этом титр клеток составлял $(4–8) \times 10^8$ кл/мл. В данном эксперименте все штаммы культивировали в условиях, определенных для модельного штамма *S. oneidensis* MR-1.

Внесено изменение в стандартный состав среды LB для биосинтеза NPs, из которой был исключен компонент NaCl. Это связано с тем, что при наличии в среде NaCl и внесении в КЖ раствора AgNO₃ происходит реакция взаимодействия между ионами Ag⁺ и Cl[–], приводящая к образованию нерастворимого AgCl, что выводит часть ионов Ag⁺ из процесса восстановления клетками до NPsAg и нарушает количественное определение Ag в составе NPs. На рис. 1 представлены фотографии колб, содержащих PC после 10 мин и 22 ч инкубации с AgNO₃.

На образование Ag-содержащих NPs указывало изменение окраски PC от светло-желтой до коричневой, что также отмечается в ряде исследований [20, 21]. Значительная разница в окраске PC видна при 10-минутной инкубации PC с AgNO₃ (рис. 1а), что может указывать на различную скорость/эффективность процесса восстановления Ag⁺ данными штаммами. Интенсивность окраски PC выравнивается при 24-часовой инкубации (рис. 1б). Для выделенных и очищенных NPs значение ОП₄₀₀ определяли при разведении исходных образцов (рис. 2а) дистиллированной водой в 10 раз (рис. 2б).

В табл. 1 представлены результаты определения ОП₄₀₀ NPs, которые выявляют значительное различие между штаммами. Так, образцы 2–4 демонстрируют наибольшие значения ОП₄₀₀ NPs, при этом ОП₆₀₀ КЖ этих штаммов находится в пределах ~0.500. Для штамма *S. oneidensis* MR-1 величина ОП₄₀₀ NPs образца 8 практически вдвое меньше по сравнению с образцами 2–4 при наибольшем значении ОП₆₀₀ КЖ 0.615. Это указывает на то, что количество клеток, играющее суще-

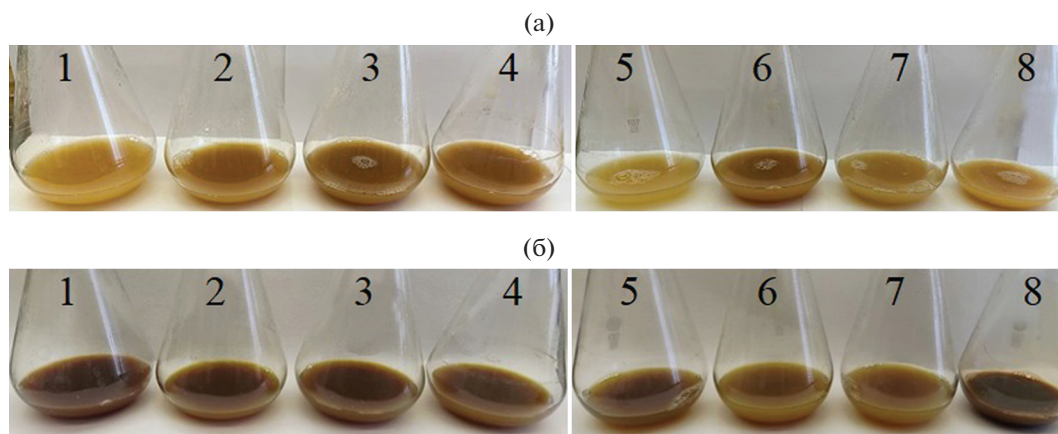


Рис. 1. Изменение окраски РС бактерий через 10 мин (а) и после 24 ч инкубации с AgNO_3 (б). Номера колб соответствуют номерам образцов в табл. 1.

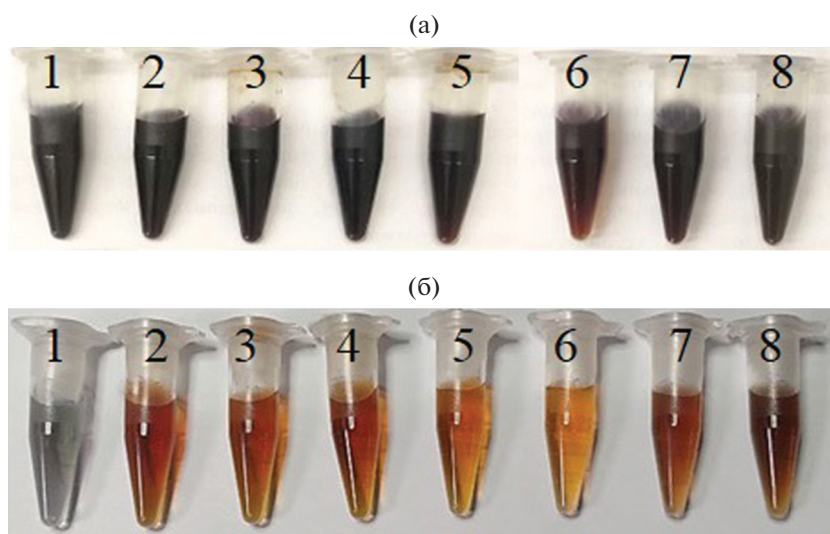


Рис. 2. Водные суспензии образцов NPAg 1–8 в концентрированном состоянии (а) и разведенные водой в 10 раз (б). Нумерация образцов по порядку.

ственную роль в процессах микробного восстановления ионов металлов, не всегда определяет уровень восстановительной способности штамма рода *Shewanella*. Таким образом, не прослеживается корреляция между значениями ОП_{600} КЖ и ОП_{400} NPs.

Отметим, что у штаммов, принадлежащих к одному виду, значения ОП_{400} NPs существенно различаются. Так, у образцов 1–5, принадлежащих *S. putrificiens*, значения ОП_{400} NPs варьируют от 0.1 до 1.1. Эти результаты указывают на различную метаболическую активность, связанную со способностью восстанавливать ионы металлов у штаммов одного рода, выделенных в различных местах обитания.

Анализ образцов по содержанию Ag АЭС-методом выявил корреляцию между значениями ОП_{400} NPs и количеством Ag в пробах. Образцы 2–4 продемонстрировали наибольшие значения как ОП_{400} NPs, так и содержания Ag. Наименьшие значения ОП_{400} NPs и содержания Ag отмечены для образца 1 (табл. 1). В табл. 1 представлен расчет содержания Ag (%) в при условии, что количество Ag в образце штамма *S. oneidensis* MR-1 (№ 8) принято за 100%. Как видно из представленных результатов, образцы 2, 3, 4 превосходят уровень образования Ag модельным штаммом *S. oneidensis* MR-1 на 10, 20 и 68% соответственно. Таким образом, на основании анализа значений ОП_{400} NPs и содержания Ag в образцах показано, что в составе наноматериала Ag присутствует в различных количествах, определяемых биологическими осо-

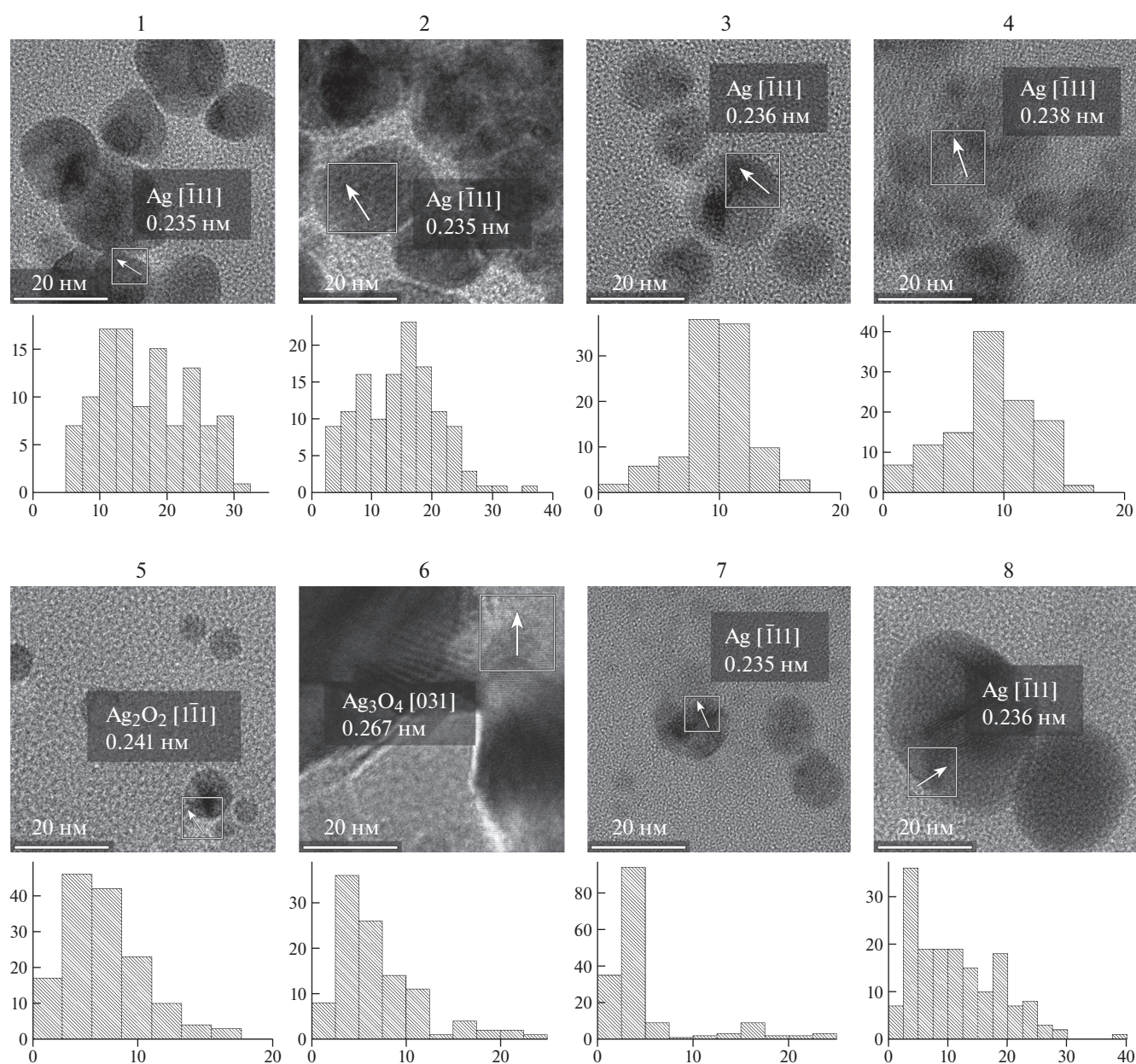


Рис. 3. ПЭМ-изображения и гистограммы распределения частиц по размерам образцов NPs 1–8. На оси ординат – количество NPs, на оси абсцисс – диаметр NPs, нм.

бенностями штаммов, что позволило выявить культуры с наиболее высоким уровнем восстанавливающей активности и продукции NPs – *S. putrifaciens* 28 Вуг, *S. putrifaciens* 34 Вуг, *S. putrifaciens* 44 Вуг (табл. 1).

Форма и размеры *NPsAg* представлены на ПЭМ-изображениях и гистограммах распределения частиц по размерам (рис. 3). Показано, что форма *NPsAg* близка к сферической, при этом гистограммы распределения по размерам различались. Образцы 1, 2 представляли собой полидисперсные системы с размерами NPs от 6 до 30 и от

3 до 35 нм соответственно; образцы 3, 4 сходны по распределению размеров NPs – от 2 до 16 нм, причем ~60% NPs обладали диаметром 10 ± 2 нм; образцы 5, 6 содержали NPs с размерами от 2 до 17 и от 2 до 24 нм соответственно, ~60% NPs обладали диаметром 5 ± 2 нм. Образец 7 наиболее монодисперсный, ~80% NPs обладали диаметром 3 ± 2 нм. Большинство NPs образца 8 имели размеры от 2 до 30 нм, ~60% NPs обладали диаметром 4 ± 2 нм.

На ПЭМ-изображениях (рис. 3) показаны кристаллические решетки NPs. Отметим, что во всех образцах обнаружено серебро с кубической

Таблица 2. Значения гидродинамического диаметра и ζ-потенциала образцов NPsAg

Образец	Средний ГД-размер частиц, нм	ГД-размер частиц (максимумы), нм	PDI	ζ-потенциал (среднее), мВ	ζ-потенциал (максимумы), мВ
1	118.7	132.5 ± 83.55	0.291	−22.2	−17.8 ± 5.90 −41.0 ± 4.59
2	37.06	59.45 ± 28.61 6.241 ± 1.554	0.357	−30.5	−10.5 ± 8.87 −49.9 ± 6.17
3	50.09	59.35 ± 38.62	0.418	−46.4	−46.4 ± 6.75
4	31.49	34.46 ± 14.63	0.305	−49.9	−49.9 ± 6.59
5	52.38	63.64 ± 27.77	0.235	−35.9	−29.7 ± 6.60 −53.8 ± 4.77
6	41.26	64.11 ± 92.1 6.810 ± 1.929	0.341	−31.2	−24.8 ± 5.40 −45.3 ± 4.41
7	47.19	79.60 ± 44.16 10.13 ± 3.298	0.397	−34.1	−22.7 ± 7.61 −47.2 ± 5.36
8	53.32	100.2 ± 65.29 12.01 ± 4013	0.478	−29.3	−22.5 ± 5.86 −48.1 ± 4.41

кристаллической решеткой. Кроме того, в образце 5 были обнаружены серебро с гексагональной решеткой и Ag₂O₂. В образце 6 обнаружен Ag₃O₄. Полученные результаты подтверждают различие в метаболической активности штаммов рода *Shewanella* из различных природных источников.

Анализ ГД и ζ-потенциала NPs показал наличие моно- и полимодального распределения размера ГД для исследуемых образцов (табл. 2).

Показано, что водные суспензии образцов 3–5 представляли собой мономодальные системы со средними значениями ГД ~30–50 нм. Бимодальное распределение размера ГД для образцов 2, 6–8 указывает на присутствие фракций частиц различной величины от 6 до 100 нм и средними значениями ~30–50 нм. Образец 1 отличался наибольшим значением ГД ~120 нм и мономодальным распределением по размеру NPs. Величины ГД свидетельствовали о наличии биослоя на поверхности нанокристаллов, что коррелирует с данными электрофоретического анализа белков. Значения ζ-потенциала практически для всех образцов, за исключением 3, 4, имеют бимодальное распределение со средними значениями ~30–50 мВ. Неоднородность отрицательного значения ζ-потенциала свидетельствовала о присутствии в системе частиц с различными размерами. Значения ζ-потенциала образцов NPs > 30, что позволяет отнести коллоидные суспензии NPs к стабильным системам. Наименьшую среднюю вели-

чину ζ-потенциала демонстрировал образец 1, что при наибольшем значении ГД свидетельствует о нестабильности коллоидной суспензии этого образца.

На основании анализа спектров поглощения образцов NPs для регистрации спектров флуоресценции были выбраны λ_в 275, 390 и 415 нм. Наибольшая флуоресценция всех образцов NPs была зафиксирована при λ_в 275 нм с максимумами, равными 330–350 и 610–620 нм, что соответствовало ультрафиолетовой и оранжевой областям спектра. Значения интенсивности флуоресценции различались для исследуемых образцов нанокристаллов. Так, для образца 1 NPs зафиксирована фоновая интенсивность со значением 0.085, тогда как максимальное значение интенсивности составило 0.7 для образца 3 NPs. Образцы 2, 4–8 NPs имели интенсивность флуоресценции от 0.25 до 0.35.

Антимикробная активность биогенных NPs является важной функциональной характеристикой наноматериала. Представляло интерес определить биоцидную активность Ag-содержащих NPs образцов 1–8, оцененных по физико-химическим характеристикам и количественному содержанию Ag в образцах, на Грам(+) и Грам(–) бактериальных штаммах. С этой целью впервые определяли величину АЕ, учитывающую диаметры зон ингибирования тест-культур и лунки для внесения суспензии NPs, как указано выше.

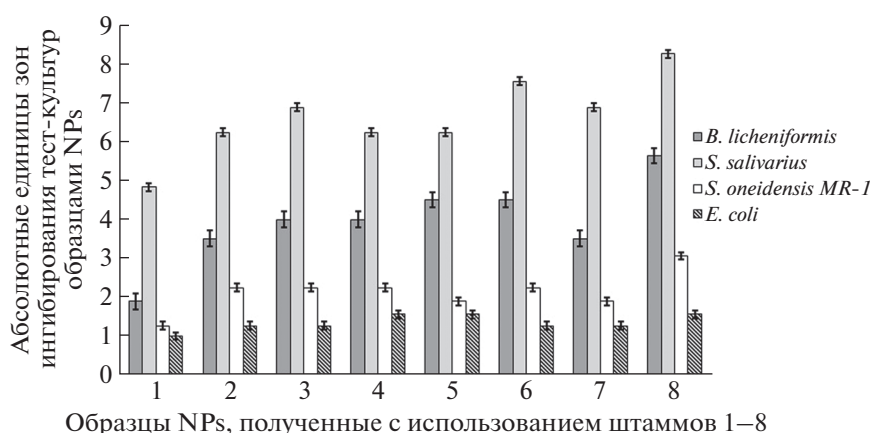


Рис. 4. Абсолютные единицы зон ингибирования тест-культур образцами NPs.

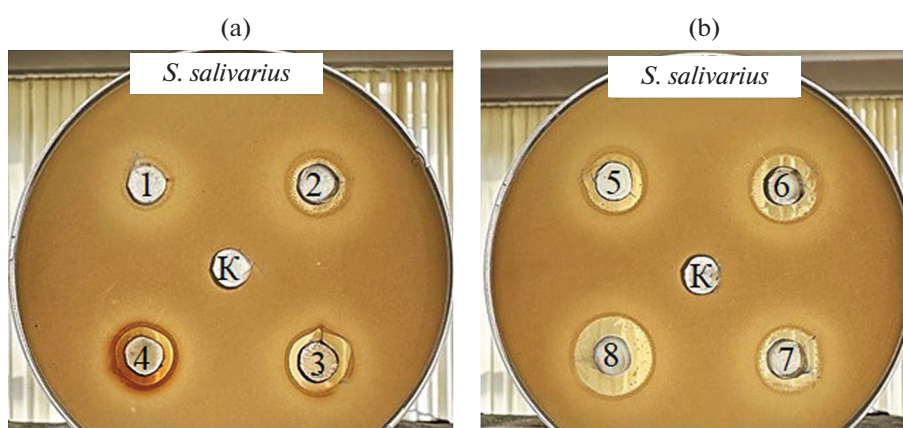


Рис. 5. Ингибирование роста тест-культуры Грам(+) бактерии *S. salivarius* в присутствии образцов 1–8 NPs.

На основании значений АЕ была построена гистограмма, отражающая уровень ингибирования тест-культур для всех исследуемых образцов NPs (рис. 4).

Как видно из рис. 4, существует различие исследуемых тест-культур по уровню чувствительности к NPs. Наиболее устойчивым штаммом к действию NPs являлся *E. coli*. Более восприимчивыми к действию биогенных NPs являлись Грам(+) бактерии *B. licheniformis* и *S. salivarius*. При этом *S. salivarius* оказался более чувствительным к действию всех исследуемых образцов NPs по сравнению с *B. licheniformis* (рис. 5).

Отметим, что 10-кратное разведение исходных суспензий NPs отражалось на размерах зон ингибирования в зависимости от тест-культуры. Уменьшение зоны ингибирования могло достигать 10–15% для *B. licheniformis*, 40–50% для *S. salivarius*, в ряде случаев показано отсутствие воздействия NPs на *S. oneidensis MR-1* и *E. coli*. Для всех образцов NPs, уравненных по ОП₄₄₀ до ~0.250, что соответствовало содержанию Ag ~0.33 мг/г,

размеры зон ингибирования тест-культур практически совпадали.

Образцы NPs по значениям АЕ биоцидной активности в отношении трех наиболее чувствительных тест-штаммов распределяются по убыванию следующим образом: 8 > 6 > 3 > 7 > 5 > 4 > 2 > 1.

Представляло интерес оценить корреляцию между количеством Ag и величинами АЕ в образцах NPs. Установлено, что образцы 2–4 с наибольшим содержанием Ag не проявляли максимальной биоцидной активности. При этом у наиболее активного образца 8 содержание Ag практически в 2 раза меньше, чем у образца 4 (0.74 против 1.24 мг/г соответственно). С другой стороны, видим корреляцию между уровнем биоцидности и низким содержанием Ag в образце 1. Полученные результаты указывают на отсутствие в ряде случаев прямой зависимости уровня биоцидной активности наноматериала от содержания металла в образце. Причиной этого явления может быть тот факт, что величина АЕ NPs — комплексный показатель, который может зависеть от

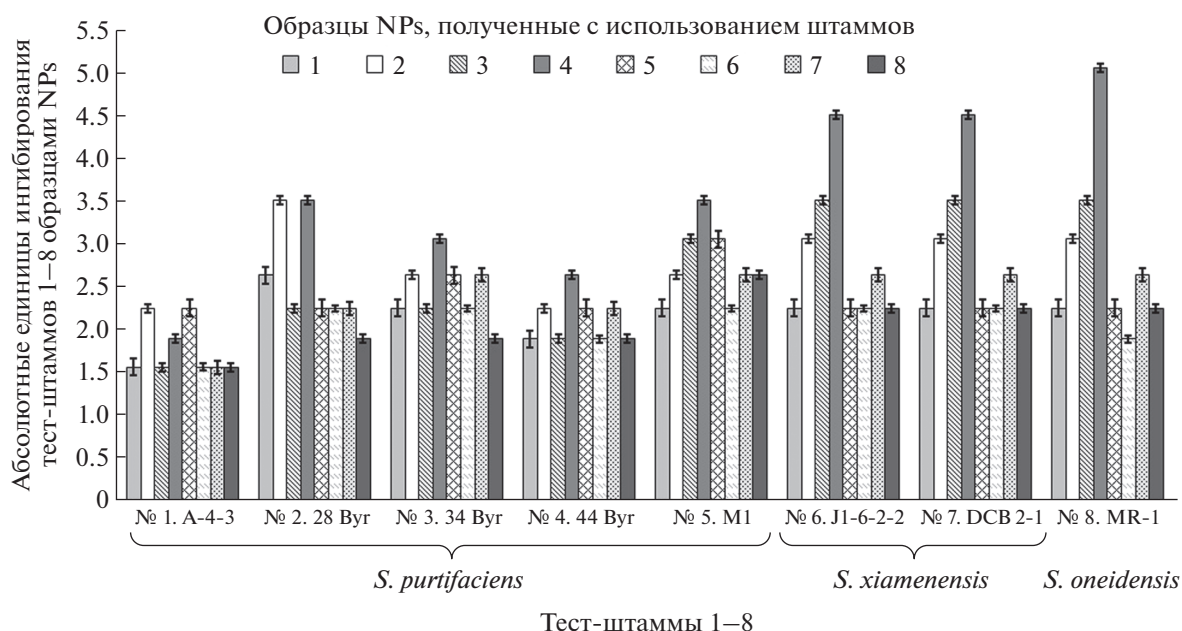


Рис. 6. Абсолютные единицы зон ингибирования восьми штаммов рода *Shewanella* образцами 1–8 NPs.

таких параметров, как размер неорганического ядра (рис. 3), величины ГД, ζ -потенциала и индекса PDI образца NPs (табл. 2).

Таким образом, для решения фундаментальной задачи оценки штаммов по восстанавливающей активности достаточно использования метода АЭС по определению содержания металла в образцах наноматериала. Тогда как для выбора штамма по функциональной характеристике биогенных NPs – антимикробной активности – необходим детальный анализ образцов по размеру неорганического ядра, индексу PDI, ГД, ζ -потенциала и диагностического теста на уровень биоцидной активности по величине АЕ.

Для ответа на фундаментальный вопрос о генетическом разнообразии штаммов рода *Shewanella* была проведена работа по оценке чувствительности исследуемых штаммов к действию Ag-содержащих NPs (рис. 6). Как видно из рис. 6, все восемь исследуемых штаммов рода *Shewanella* различались по чувствительности к действию образцов NPs 1–8. Так, штамм 1 проявил наибольшую устойчивость к действию практически всех NPs. Штаммы 6–8 оказались наиболее восприимчивыми к действию NPs 2–4, содержащих наибольшее количество Ag в образцах (0.81, 0.89 и 1.24 мг/г соответственно). Однако наличие большого количества Ag не всегда является определяющим фактором высокого уровня биоцидной активности NPs, как и в случае с использованием ранее рассмотренных тест-культур (рис. 4). Так, образец 4 NPs Ag с максимальным содержанием Ag (1.24 мг/г) не оказывал значительного воздей-

ствия на штаммы *S. putrifaciens* 1–4. Не установлена корреляция между уровнем биоцидной активности и размером частиц, поскольку образцы NPs в основном являлись полидисперсными и диаметры неорганических ядер находились в близких значениях.

Таким образом, для характеризующихся высокими значениями АЕ образцов NPs установлено убывание активности в порядке: $4 > 3 > 2 > 7$, которое характерно преимущественно для тест-штаммов 5–8.

Полученные результаты свидетельствуют о различном уровне устойчивости штаммов к биогенным Ag-содержащим NPs, синтезированным с использованием данных бактерий. Это еще раз подтверждает метаболическое разнообразие штаммов рода *Shewanella*, выделенных из различных природных источников.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены биогенные Ag-содержащие NPs с использованием восьми штаммов рода *Shewanella*, выделенных из разных природных источников. Установлено различие штаммов по уровню восстанавливающей способности Ag^+ . Впервые проведен сравнительный анализ количественного содержания Ag в составе образцов NPs, позволивший выявить штаммы с высокой восстановительной активностью. Установлено, что все образцы NPs сходны по морфологическим и физико-химическим характеристикам. Анализ кристаллических решеток всех исследуемых на-

ноструктур показал присутствие NPsAg , а также наличие NPsAg_2O_2 и NPsAg_3O_4 в некоторых образцах. Получены результаты оценки биоцидных свойств NPs в отношении Грам(+) и Грам(–) тест-культур, а также исследуемых штаммов рода *Shewanella*. Представлен детальный анализ уровня устойчивости восьми штаммов рода *Shewanella* к действию биогенных NPs , демонстрирующей фундаментальное метаболическое разнообразие исследуемых штаммов, выделенных из различных мест обитания.

Авторы выражают благодарность Национальному биоресурсному центру – Всероссийский коллекция промышленных микроорганизмов НИЦ “Курчатовский институт” за предоставление штаммов микроорганизмов, использованных в работе.

Аналитические исследования выполнены с использованием оборудования Ресурсных центров: оптической микроскопии и спектроскопии, зондовой и электронной микроскопии НИЦ “Курчатовский институт”, ЦКП “Исследовательский химико-аналитический центр НИЦ “Курчатовский институт” при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Соглашение № 075-15-2023-370 от 22.02.2023) и при частичной финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (грант № 122040800164-6).

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ “Курчатовский институт”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gahlawat G., Choudhury A.R. // RSC Adv. 2019. V. 9. № 23. P. 12944. <https://doi.org/10.1039/C8RA10483B>
2. Alsharif S.M., Salem S.S., Abdel-Rahman M.A. et al. // Heliyon. 2020. V. 6. № 5. e03943. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03943>
3. Singh J., Dutta T., Kim K.-H. et al. // J. Nanobiotechnol. 2018. V. 16. № 84. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0408-4>
4. Singh L. Novel Catalyst Materials for Bioelectrochemical Systems: Fundamentals and Applications Washington: American Chemical Society, 2020. p. 97. <https://doi.org/10.1021/bk-2020-1342.ch005>
5. Konstantinidis K.T., Serres M.H., Romine M.F. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2009. V. 106. № 37. P. 15909. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902000106>
6. Rajput V.D., Minkina T., Kimber R.L. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2021. V. 87. № 22. e01390-21. <https://doi.org/10.1128/AEM.01390-21>
7. Wildung R.E., Gorby Y.A., Krupka K.M. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. № 6. P. 2451. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2451-2460.2000>
8. Janda J.M., Abbott S.L. // Crit. Rev. Microbiol. 2014. V. 40. № 4. P. 293. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.726209>
9. Coursolle D., Gralnick J.A. // Mol. Microbiol. 2010. V. 77. № 4. P. 995. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07266.x>
10. Edwards M.J., White G.F., Norman M. et al. // Transfer. Sci. Rep. 2015. V. 5. 11677. <https://doi.org/10.1038/srep11677>
11. Strycharz-Glaven S.M., Snider R.M., Guiseppi-Elie A. et al. // Energy Environ. Sci. 2011. V. 4. № 11. P. 4366. <https://doi.org/10.1039/C1EE01753E>
12. Yang Y., Chen J., Qiu D. et al. // BMC Microbiol. 2013. V. 13. № 1. 267. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-267>
13. Wang F., Wang P., Chen M. et al. // Extremophiles. 2004. V. 8. P. 165. <https://doi.org/10.1007/s00792-003-0365-0>
14. Fredrickson J.K., Romine M.F., Beliaev A.S. et al. // Nat. Rev. Microbiol. 2008. V. 6. № 8. P. 592. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1947>
15. Zhong C., Han M., Shaojun Yu. et al. // Biotechnol. Biofuels. 2018. V. 6. № 11. P. 193. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1201-1>
16. Zhuravliova O.A., Voeikova T.A., Vlasova A.Yu. et al. // Nanobiotechnology Reports. 2023. V. 18. № 3. P. 384. <https://doi.org/10.1134/S263516762370026X>
17. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E. et al. // Nat. Methods. 2012. V. 9. P. 676. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
18. Abdelsalam K.M., Shaltout N.A., Ibrahim H.A. et al. // Oceanologia. 2022. V. 64. № 1. P. 35. <https://doi.org/10.1016/j.oceano.2021.08.004>
19. Журавлева О.А., Воейкова Т.А., Кулигин В.С. и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2021. Т. 98. № 4. С. 416. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-89>
20. Suresh A.K., Pelletier D.A., Wang W. et al. // Env. Sci. Tech. 2010. V. 44. № 13. P. 5210. <https://doi.org/10.1021/es903684r>
21. Alsharif S.M., Salem S.S., Abdel-Rahman M.A. et al. // Heliyon. 2020. V. 6. № 5. e03943. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03943>